



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117203347 A

(43) 申请公布日 2023. 12. 08

(21) 申请号 202280029392.7

(22) 申请日 2022.04.19

(30) 优先权数据

2021-070615 2021.04.19 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.10.18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2022/018185 2022.04.19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/224960 JA 2022.10.27

(71) 申请人 电化株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 伊藤康树 阿部淳一 冈田裕正

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事

务所(普通合伙) 11277

专利代理师 刘新宇 李恩华

(51) Int.Cl.

C12Q 1/26 (2006.01)

权利要求书1页 说明书16页 附图3页

(54) 发明名称

试剂组合物和试剂盒

(57) 摘要

一种试剂组合物,其具有选自由胆固醇酯酶活性、胆固醇氧化酶活性和鞘磷脂酶活性组成的组中的1种或2种以上的活性,并且包含聚氧乙烯单苯乙烯化苯基醚,所述试剂组合物在对试样中的sdLDL-C进行定量的方法中作为第1试剂组合物使用,所述方法包括下述工序:使第1试剂组合物作用于试样的工序;和,在使第1试剂组合物作用于试样的工序之后,使用以对小而密低密度脂蛋白胆固醇(sdLDL-C)进行定量的第2试剂组合物进行作用,从而对残留的脂蛋白中的胆固醇进行定量的工序。

1. 一种试剂组合物, 其具有选自由胆固醇酯酶活性、胆固醇氧化酶活性和鞘磷脂酶活性组成的组中的1种或2种以上的活性, 并且包含聚氧乙烯单苯乙烯化苯基醚,

所述试剂组合物在对试样中的sdLDL-C进行定量的下述方法中作为第1试剂组合物使用,

所述方法包括下述工序:

使所述第1试剂组合物作用于所述试样的工序; 和

在使所述第1试剂组合物作用于所述试样的所述工序之后, 使用于定量小而密低密度脂蛋白胆固醇 (sdLDL-C) 的第2试剂组合物进行作用, 从而对残留的脂蛋白中的胆固醇进行定量的工序。

2. 根据权利要求1所述的试剂组合物, 其中, 所述聚氧乙烯单苯乙烯化苯基醚中, 聚氧乙烯的聚合度 n 为5以上且80以下。

3. 根据权利要求1或2所述的试剂组合物, 其中, 该试剂组合物中的所述聚氧乙烯单苯乙烯化苯基醚的含量相对于该试剂组合物整体为0.05% (w/v) 以上且0.6% (w/v) 以下。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的试剂组合物, 其中, 该试剂组合物还具有选自由过氧化物酶活性和过氧化氢酶活性组成的组中的至少1种活性。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的试剂组合物, 其中, 该试剂组合物包含氢供体和偶联剂中的任一者。

6. 一种用于试样中的sdLDL-C的定量的试剂盒, 其包含:

由权利要求1至5中任一项所述的试剂组合物构成的第1试剂组合物、和

用于对所述sdLDL-C进行定量的第2试剂组合物。

7. 根据权利要求6所述的试剂盒, 其中, 所述第2试剂组合物具有过氧化物酶活性。

8. 根据权利要求6或7所述的试剂盒, 其中, 所述第1试剂组合物包含氢供体和偶联剂中的任一者且不包含另一者,

所述第2试剂组合物不包含所述氢供体和所述偶联剂中的所述一者且包含所述另一者。

试剂组合物和试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及试剂组合物和试剂盒。

背景技术

[0002] 作为与LDL胆固醇的测定方法相关的技术,有专利文献1(日本特开2000-325097号公报)中记载的技术。该文献记载了脂蛋白胆固醇的测定方法,其包括下述工序:第1工序,通过向含有脂蛋白的试样中加入酶和第1表面活性剂,从而对HDL胆固醇选择性地酶反应;第2工序,通过加入第2表面活性剂,从而对LDL胆固醇选择性地酶反应;和,测定在第1或第2工序中通过与酶的反应而消耗的化合物或生成的化合物,从而测定HDL胆固醇和/或LDL胆固醇(权利要求1)。并且,根据所述方法,可以提供无需提高反应液浊度的脂蛋白凝集剂、使用的酶无限制且在使LDL胆固醇进行反应的工序中也无需新加入其它酶即可简便且廉价地定量LDL胆固醇、另外根据需要可无需形成会妨碍HDL胆固醇的光学测定的脂蛋白凝集物而能够准确且廉价地进行测定的测定方法和测定试剂,因此据称在动脉硬化症等临床检查领域中尤其有用(段落0055)。

[0003] 现有技术文献

[0004] 专利文献

[0005] 专利文献1:日本特开2000-325097号公报

发明内容

[0006] 发明要解决的问题

[0007] 本发明人们对于测定LDL胆固醇中的小而密低密度脂蛋白胆固醇(sdLDL-C)进行了研究。于是发现了专利文献1记载的技术在测定的准确性方面有改善的余地。

[0008] 本发明提供准确性优异的sdLDL-C测定技术。

[0009] 用于解决问题的方案

[0010] 根据本发明,提供以下的试剂组合物和试剂盒。

[0011] [1]一种试剂组合物,其具有选自由胆固醇酯酶活性、胆固醇氧化酶活性和鞘磷脂酶活性组成的组中的1种或2种以上的活性,并且包含聚氧乙烯单苯乙烯化苯基醚,

[0012] 所述试剂组合物在对试样中的sdLDL-C进行定量的下述方法中作为第1试剂组合物使用,

[0013] 所述方法包括下述工序:

[0014] 使上述第1试剂组合物作用于上述试样的工序;和

[0015] 在使上述第1试剂组合物作用于上述试样的上述工序之后,使用于定量小而密低密度脂蛋白胆固醇(sdLDL-C)的第2试剂组合物进行作用,从而对残留的脂蛋白中的胆固醇进行定量的工序。

[0016] [2]根据[1]所述的试剂组合物,其中,上述聚氧乙烯单苯乙烯化苯基醚中,聚氧乙烯的聚合度n为5以上且80以下。

[0017] [3]根据[1]或[2]所述的试剂组合物,其中,该试剂组合物中的上述聚氧乙烯单苯乙烯化苯基醚的含量相对于该试剂组合物整体为0.05% (w/v) 以上且0.6% (w/v) 以下。

[0018] [4]根据[1]至[3]中任一项所述的试剂组合物,其中,该试剂组合物还具有选自过氧化物酶活性和过氧化氢酶活性组成的组中的至少1种活性。

[0019] [5]根据[1]至[4]中任一项所述的试剂组合物,其中,该试剂组合物包含氢供体和偶联剂中的任一者。

[0020] [6]一种用于试样中的sdLDL-C的定量的试剂盒,其包含:

[0021] 由[1]至[5]中任一项所述的试剂组合物构成的第1试剂组合物、和用于对上述sdLDL-C进行定量的第2试剂组合物。

[0022] [7]根据[6]所述的试剂盒,其中,上述第2试剂组合物具有过氧化物酶活性。

[0023] [8]根据[6]或[7]所述的试剂盒,其中,上述第1试剂组合物包含氢供体和偶联剂中的任一者且不包含另一者,

[0024] 上述第2试剂组合物不包含上述氢供体和上述偶联剂中的上述一者且包含上述另一者。

[0025] 发明的效果

[0026] 根据本发明,可以提供准确性优异的sdLDL-C测定技术。

附图说明

[0027] 图1为示出sdLDL-C的测定值的准确性的评价结果的图。

[0028] 图2为示出sdLDL-C的测定值的准确性的评价结果的图。

[0029] 图3为示出sdLDL-C的测定值的准确性的评价结果的图。

具体实施方式

[0030] 以下对实施方式进行说明。本实施方式中,测定试剂等组合物可以单独包含各成分或组合2种以上而包含。另外,本说明书中,数值范围“x~y”表示“x以上且y以下”,下限值x和上限值y均包含在内。

[0031] 首先对脂蛋白进行说明。

[0032] 脂蛋白大致分为极低密度脂蛋白(Very Low Density Lipoprotein:VLDL)、低密度脂蛋白(Low Density Lipoprotein:LDL)和高密度脂蛋白(High Density Lipoprotein:HDL)的级分,LDL进而分为小而密低密度脂蛋白(sdLDL)和除此以外的亚级分。也有时将sdLDL称为小粒子LDL、small LDL(SLDL)、dense LDL、small,dense LDL,另外也有时将除此以外的LDL称为大粒子LDL(LLDL)、轻LDL或大而轻LDL(1bLDL)。

[0033] 这些脂蛋白的级分和亚级分可以通过颗粒尺寸或密度来区分。

[0034] 关于脂蛋白的颗粒尺寸即直径,根据报道者而不同,例如VLDL为30nm~80nm(或30nm~75nm)、LDL为22nm~28nm(或19nm~30nm)、HDL为7~10nm。

[0035] 关于脂蛋白的密度,例如VLDL为1.006g/cm³以下、LDL为1.019~1.063g/cm³、HDL为1.063~1.21g/cm³。

[0036] 脂蛋白中,LDL颗粒直径可以利用例如梯度凝胶电泳(GGE)(JAMA,260,p.1917-21,1988)、NMR(HANDBOOK OF LIPOPROTEIN TESTING 2ndEdition,Nader Rifai等编辑,p.609-

623、AACC PRESS:TheFats of Life Summer 2002、LVDD 15YEAR ANNIVERSARY ISSUE、Volume AVI No.3、p.15-16) 进行测定。另外,密度可以基于例如通过超速离心分离的分析(Atherosclerosis,106,p.241-253,1994:Atherosclerosis,83,p.59,1990) 来确定。

[0037] 本实施方式中想要测定的sdLDL通常是指LDL级分中直径为约22.0~约25.5nm的亚级分、或者密度 $1.040 \sim 1.063\text{g/cm}^3$ 的亚级分。

[0038] 之所以按大小将LDL分为亚级分,是因为LDL中粒径越小者越容易引发动脉硬化,在LDL中恶性度越高,因此需要单独测定LDL中较小者。在LDL内直径分布、密度分布是连续的,无法明确地区分密度为何种程度以上时恶性度特别高。因此,上述的密度 $1.040 \sim 1.063\text{g/cm}^3$ 的值也并非确立为sdLDL的特性,而是用中间值将广泛使用的可称为确定值的LDL的密度范围 $1.019 \sim 1.063\text{g/cm}^3$ 分开后的高密度侧的值。例如,对于sdLDL的密度,在其它报告中,被分级为 $1.044 \sim 1.060\text{g/cm}^3$ (Atherosclerosis:106 241-2531994)。采用何种范围的sdLDL的密度这一点因报告者不同而略有差异,但是以该范围进行识别时sdLDL的存在均与临床恶性度有关。

[0039] 本说明书中,称为sdLDL时具体是指:LDL中的密度大、且与除此以外的LDL相比临床上更容易引发动脉硬化者。另外,sdLDL优选是指属于LDL的密度范围内高于中间值的密度范围的LDL,更优选是指属于密度 $1.044 \sim 1.063\text{g/cm}^3$ 的范围的LDL。另外,称为除LDL以外的脂蛋白时,是指VLDL或HDL,进而还包括乳糜微粒、中间密度脂蛋白(intermediate density lipoprotein)或VHDL(very high density lipoprotein)。

[0040] 本发明人为了提高对试样中的sdLDL-C进行定量时的准确性而进行了研究。结果获知,在想要通过下述方法对sdLDL-C进行定量时,重要的是在第1工序中将第1试剂组合物对除sdLDL以外的LDL的作用的选择性控制为高水平,所述方法包括下述工序:使第1试剂组合物作用于试样的工序(第1工序);和,之后使用于对sdLDL胆固醇(sdLDL-C)进行定量的第2试剂组合物进行作用,从而对残留的脂蛋白中的胆固醇进行定量的工序(第2工序)。更具体而言,已获知:重要的是在第1工序中第1试剂组合物选择性地作用于除sdLDL以外的LDL,选择性过低时,即,第1试剂组合物为也容易作用于作为测定对象的sdLDL的试剂时,有第2工序中试样中的sdLDL-C的定量准确性下降之虞。

[0041] 因此,本发明人为了使第1试剂组合物的作用选择性更好而进行了进一步研究,结果发现,通过使第1试剂组合物采取具有特定的酶活性且包含特定的表面活性剂的构成,从而可稳定地得到以高选择性作用于除sdLDL以外的LDL的第1试剂组合物。

[0042] 进而获知,作为表面活性剂,可使用聚氧乙烯苯乙烯化苯基醚衍生物或聚氧乙烯二苯乙烯化苯基醚。但是,本发明人们在深入研究中首次发现,在聚氧乙烯苯乙烯化苯基衍生物中,聚氧乙烯单苯乙烯化苯基醚的存在可提高试样与第1试剂组合物反应时对LDL的选择性,其结果是能够准确地测定sdLDL-C。

[0043] 以下对各试剂组合物进一步进行具体说明。

[0044] (试剂组合物(第1试剂组合物))

[0045] 本实施方式中,试剂组合物为在对试样中的sdLDL-C进行定量的下述方法中作为第1试剂组合物使用的试剂组合物,所述方法包括下述工序:使第1试剂组合物作用于试样的工序;和,在使第1试剂组合物作用于试样的工序之后,使用于对sdLDL-C进行定量的第2试剂组合物进行作用,从而对残留的脂蛋白中的胆固醇进行定量的工序。第1试剂组合物的

性状具体而言为液体。

[0046] 以下也将用作第1试剂组合物的试剂组合物简称为“第1试剂组合物”。

[0047] 第1试剂组合物具有选自由胆固醇酯酶活性、胆固醇氧化酶活性和鞘磷脂酶活性组成的组中的1种或2种以上活性,并且包含聚氧乙烯单苯乙烯化苯基醚。

[0048] 本实施方式中,第1试剂组合物包含特定的非离子表面活性剂且具有特定的酶活性,因此将第1试剂组合物添加到试样中时,以高选择性稳定地作用于试样中的除sdLDL以外的LDL并将其去除。另外,能够以高选择性稳定地将除sdLDL以外的LDL中的胆固醇导出到反应体系外。

[0049] 在此,“表面活性剂进行作用(反应)”是指:表面活性剂使脂蛋白分解、使脂蛋白中的胆固醇游离。例如称为“作用于除sdLDL以外的脂蛋白(与除sdLDL以外的脂蛋白进行反应)的表面活性剂”时,不要求表面活性剂完全不作用于sdLDL,只要主要作用于除sdLDL以外的脂蛋白即可。称为“作用于除sdLDL以外的LDL(与除sdLDL以外的LDL进行反应)的表面活性剂”时也同样,只要表面活性剂主要作用于除sdLDL以外的LDL即可。“去除”是指:将被检体试样中的物质分解且使其分解物在下一个工序中检测不出。即,“去除除sdLDL以外的脂蛋白中的胆固醇”是指将被检体试样中的除sdLDL以外的脂蛋白分解且使其作为其分解产物的这些脂蛋白中的胆固醇在之后的工序中检测不出。关于“去除除sdLDL以外的LDL中的胆固醇”也同样,是指使被检体试样中的除sdLDL以外的LDL中的胆固醇在此后的工序中检测不出。

[0050] “导出到反应体系外”具体而言是指:为了避免HDL、VLDL、LDL等中所含的胆固醇对sdLDL-C的定量造成影响,将HDL、VLDL、LDL等中所含的胆固醇去除、使其凝集或对其进行抑制而使其在后续工序中不反应。

[0051] 以下对第1试剂组合物中所含的成分进行更具体地说明。

[0052] (聚氧乙烯单苯乙烯化苯基醚)

[0053] 第1试剂组合物包含聚氧乙烯单苯乙烯化苯基醚(POE单苯乙烯化苯基醚)。

[0054] POE单苯乙烯化苯基醚可以由POE部分的聚合度不同的多种化合物构成。此时,从提高sdLDL-C的定量中的准确性的观点出发,POE单苯乙烯化苯基醚中的聚氧乙烯的聚合度n优选5以上,另外为80以下。另外,从提高sdLDL-C的定量中的准确性的观点出发,氧亚乙基的平均聚合度例如超过1、优选5以上、更优选10以上,另外,例如为100以下、优选80以下、更优选50以下、进一步优选40以下,另外例如可以为30以下。

[0055] 在此,平均聚合度由利用NMR测定的POE单苯乙烯化苯基醚的氧亚乙基信号的强度来求出。例如,在POE单苯乙烯化苯基醚的TMS衍生物的NMR谱中,可以以0.08ppm的TMS基的质子(9个)的强度为基准通过3.5ppm的POE部分的亚甲基质子(4个)的信号强度比来计算。

[0056] 另外,从进一步稳定地提高sdLDL-C的定量中的准确性的观点出发,优选包含选自POE单苯乙烯化苯基醚中的氧亚乙基的平均聚合度n为 $n=10\sim 20$ 的化合物组成的组中的1种以上。

[0057] 在此,构成POE单苯乙烯化苯基醚的成分的氧亚乙基的聚合度由基于液相色谱质谱联用分析的结构分析来求出。例如,通过液相色谱(LC)将第1试剂组合物中的POE单苯乙烯化苯基醚分离后,导入到四极杆飞行时间型质谱仪(QTOF mass spectrometer),则根据每种成分的氧亚乙基的聚合度的不同而得到包含44amu间隔的峰的质谱。从由各峰的m/z推

断的分子量中减去单苯乙烯化苯酚的质量数(MW198)再除以44,由此可以计算各成分的氧亚乙基的聚合度。进而,从由每个峰的精确质量得到的组成式减去单苯乙烯化苯酚的化学组成($C_{14}H_{14}O$)或进行产物离子扫描来进行详细的结构分析,由此可以分析各成分的氧亚乙基的聚合度。

[0058] 关于第1试剂组合物中的POE单苯乙烯化苯基醚的含量,从提高sdLDL-C的定量中的准确性的观点出发,相对于第1试剂组合物整体优选0.01% (w/v) 以上,更优选0.03% (w/v) 以上、进一步优选0.05% (w/v) 以上、进一步更优选0.1% (w/v) 以上。

[0059] 另外,从同样的观点出发,第1试剂组合物中的POE单苯乙烯化苯基醚的含量相对于第1试剂组合物整体优选0.6% (w/v) 以下,更优选0.4% (w/v) 以下、进一步优选0.35% (w/v) 以下、进一步更优选0.3% (w/v) 以下。

[0060] 在此,POE单苯乙烯化苯基醚可以作为工业用原料或研究用试剂而获得,例如可以使用市售品。

[0061] 另外,例如也可以制造POE单苯乙烯化苯基醚并使用。具体而言可以通过下述的方法、条件来进行制造。

[0062] 即,POE单苯乙烯化苯基醚可以通过在碱性催化剂存在下对单苯乙烯化苯酚加成规定量的环氧乙烷而得到。作为碱性催化剂,可列举氢氧化钠、氢氧化钾、碱金属的醇盐等。加成反应温度优选120~200℃。

[0063] 另一方面,苯乙烯化苯酚可通过使苯酚与苯乙烯在酸催化剂下在70℃~200℃的温度下进行烷基化反应而得到。作为酸催化剂,可以使用硫酸、磷酸等无机酸、对甲苯磺酸、甲磺酸等有机酸、三氟化硼二乙基醚络合物等路易斯酸等。可以通过在该反应中控制苯酚与苯乙烯的当量比、酸催化剂的种类、反应温度等条件而得到在苯酚和苯环上键合有1个苯乙烯的单苯乙烯化苯酚。

[0064] 单苯乙烯化苯酚例如可以如下合成:在磷酸催化剂下向苯酚中滴加加入苯乙烯而进行烷基反应后,为了除去未反应的苯酚和苯乙烯而添加硫酸或硫酸镁催化剂而使烷基反应完成。此时磷酸催化剂的使用量相对于苯酚优选0.001~0.01当量。关于硫酸或硫酸镁催化剂的使用量,以磷酸催化剂的质量为基准优选2质量%~10质量%。另外,关于苯酚与苯乙烯的当量比,以苯乙烯相对于苯酚的当量比计优选0.9~1.3。

[0065] 接着在烷基化反应结束后,添加碳酸钠、碳酸钾、氢氧化钠、氢氧化钾等的水溶液而将烷基化反应的产物中和,通过过滤而除去生成的中和盐,由此可以回收单苯乙烯化苯酚。

[0066] 然后,在高压釜等耐压容器中,以氢氧化钾为催化剂在加热加压下使得到的单苯乙烯化苯酚和环氧乙烷进行加成反应,由此可以得到POE单苯乙烯化苯基醚。加热加压条件例如设为压力1.5kg/cm³左右、温度130℃左右。另外,通过调整环氧乙烷相对于1摩尔单苯乙烯化苯酚的摩尔比,可以调整氧亚乙基单元的重复单元数、即氧亚乙基的聚合度。

[0067] 另外,在以上的方法中,作为苯乙烯化苯酚,得到单苯乙烯化苯酚、键合有2个苯乙烯的二苯乙烯化苯酚和键合有3个苯乙烯的三苯乙烯化苯酚的混合物,也可以从混合物中分离纯化单苯乙烯化苯酚并使用。

[0068] 第1试剂组合物中的POE单苯乙烯化苯基醚例如可以通过将IR、NMR、LC-MS等组合而进行分析的方法来确认。作为确定第1试剂组合物中的POE单苯乙烯化苯基醚的结构的方法

法,可列举使用LC/MS/MS、NMR进行分析的方法。

[0069] 另外,第1试剂组合物中的POE单苯乙烯化苯基醚的浓度例如可以通过HPLC或LC/MS测定来进行计算。另外,通过NMR测定,还可以得到第1试剂组合物中的POE单苯乙烯化苯基醚的浓度。

[0070] (酶)

[0071] 第1试剂组合物具有选自胆固醇酯酶(CHE)活性、胆固醇氧化酶(COO)活性和鞘磷脂酶活性组成的组中的1种或2种以上活性。

[0072] 从使第1试剂组合物更稳定地作用于除sdLDL以外的脂蛋白并将该胆固醇导出到反应体系外的观点出发,第1试剂组合物优选还具有选自过氧化物酶活性(POD)和过氧化氢酶活性组成的组中的至少1种活性。

[0073] 在此,“具有胆固醇酯酶活性”具体是指:存在具有将底物-胆固醇酯水解的能力的酶(例如胆固醇酯酶),可发生胆固醇酯酶所催化的反应。关于胆固醇氧化酶活性等其它酶活性,也同样。

[0074] “具有鞘磷脂酶活性”是指:存在具有将底物-鞘磷脂分解的能力的酶,可发生酶所催化的反应。作为具有鞘磷脂酶活性的酶,除了包括鞘磷脂酶C、鞘磷脂酶D以外,还包括具有分解鞘磷脂能力的磷脂酶C、磷脂酶D。

[0075] 另外,第1试剂组合物具体而言包含选自具有胆固醇酯酶活性的酶、具有胆固醇氧化酶活性的酶、和具有鞘磷脂酶活性的酶组成的组中的至少1种酶,进一步具体而言包含选自胆固醇酯酶、胆固醇氧化酶和鞘磷脂酶组成的组中的至少1种。

[0076] 从使第1试剂组合物更稳定地作用于除sdLDL以外的脂蛋白并将该胆固醇导出到反应体系外的观点出发,第1试剂组合物优选还包含选自具有过氧化物酶活性的酶和具有过氧化氢酶活性的酶组成的组中的至少1种酶,进一步具体而言优选包含过氧化物酶和过氧化氢酶中的至少1种。

[0077] 作为胆固醇酯酶、胆固醇氧化酶、鞘磷脂酶、过氧化物酶和过氧化氢酶,可以分别使用例如源自细菌和菌类的酶、源自植物的酶。

[0078] 关于第1试剂组合物的胆固醇酯酶活性,从将除sdLDL以外的脂蛋白中的胆固醇更稳定地导出到反应体系外的观点出发,优选50U/L以上、更优选100U/L以上,另外,优选3000U/L以下、更优选2500U/L以下、进一步优选2000U/L以下、进一步更优选1000U/L以下,另外,可以为例如1800U/L以下或例如1500U/L以下。

[0079] 关于第1试剂组合物的胆固醇氧化酶活性,从将除sdLDL以外的脂蛋白中的胆固醇更稳定地导出到反应体系外的观点出发,优选100U/L以上、更优选150U/L以上,另外,优选800U/L以下、更优选750U/L以下、进一步更优选700U/L以下、更进一步优选650U/L以下、进一步还优选600U/L以下。

[0080] 关于第1试剂组合物的鞘磷脂酶活性,从将除sdLDL以外的脂蛋白中的胆固醇更稳定地导出到反应体系外的观点出发,优选100U/L以上、更优选200U/L以上,另外,优选3000U/L以下、更优选2800U/L以下。

[0081] 关于第1试剂组合物的过氧化物酶活性,从将除sdLDL以外的脂蛋白中的胆固醇更稳定地导出到反应体系外的观点出发,优选200U/L以上、更优选300U/L以上,另外,优选3000U/L以下、更优选2500U/L以下,另外,也优选例如2000U/L以下。另外,第1试剂组合物的

过氧化物酶活性可以为例如5000U/L以下或例如4000U/L以下。

[0082] 关于第1试剂组合物的过氧化氢酶活性,从稳定地除去对试样应用第1试剂组合物时产生的过氧化氢的观点和将试样中的除sdLDL以外的脂蛋白中的胆固醇更稳定地导出到反应体系外的观点出发,优选100KU/L以上、更优选200KU/L以上,另外,优选2000KU/L以下、更优选1500KU/L以下。

[0083] 第1试剂组合物的胆固醇氧化酶活性、胆固醇酯酶活性、鞘磷脂酶活性、过氧化物酶活性和过氧化氢酶活性例如可以分别通过以下方法来测定。

[0084] 在胆固醇氧化酶活性的测定中,作为底物液,使用6mM胆固醇溶液(溶解于异丙醇)。对于测定对象,以成为2~4U/mL的方式加入稀释液(0.1M磷酸缓冲液、TritonX100、pH7.0),将稀释后的溶液3mL在37℃加热5分钟后加入底物液0.05mL。然后,将混合液在37℃下反应并测定波长240nm吸光度变化量。在37℃下反应后,测定从2分钟到7分钟为止的吸光度变化量,计算出胆固醇氧化酶活性。例如,吸光度变化量若为3U/L以上,则可以说测定对象存在胆固醇氧化酶活性,进一步具体而言可以说包含胆固醇氧化酶。

[0085] 胆固醇酯酶活性的测定中,使用底物(0.04%胆固醇亚麻酸酯、1% TritonX100、0.6%胆酸钠溶液)、300U/mL胆固醇氧化酶溶液、酶稀释液(20mM磷酸缓冲液、0.5mM EDTA·2Na、2mM MgCl₂、0.2%牛血清白蛋白(BSA)、pH7.5)、反应液(0.06%4-氨基安替比林、0.4%苯酚、7.5KU/L过氧化物酶(POD))。将反应液1.75mL和底物液1.0mL混合后,在37℃下加热5分钟,加入0.1mL胆固醇氧化酶溶液。进行37℃、2分钟加热后加入用稀释液稀释的测定对象0.1mL,将混合液在37℃下进行反应,测定波长500nm的吸光度变化量。37℃反应后,测定从0分钟到3.5分钟为止的吸光度变化量,计算胆固醇酯酶活性。例如,吸光度变化量若为8U/L以上,则可以说测定对象存在胆固醇酯酶活性,进一步具体而言,可以说包含胆固醇酯酶。

[0086] 第1试剂组合物的鞘磷脂酶活性例如通过以下方法来测定。即,使用反应液(0.008%鞘磷脂、0.05% TritonX100溶液、10U/mL碱性磷酸酶、10U/mL胆固醇氧化酶、2U/mL过氧化物酶、0.02%4-氨基安替比林、0.02% TODB混合液)、反应终止液(1%十二烷基硫酸钠溶液)、稀释液(10mM Tris缓冲液、0.1% TritonX100、pH8.0)。将反应液0.08mL和用稀释液稀释的测定对象0.003mL混合并在37℃下加热5分钟后,加入反应终止液0.16mL。在反应终止后测定主波长546nm、副波长700nm的吸光度变化量,计算鞘磷脂酶活性。例如,吸光度变化量若为2U/L以上,则可以说测定对象存在鞘磷脂酶活性,进一步具体而言,可以说包含鞘磷脂酶。

[0087] 第1试剂组合物的过氧化物酶活性例如通过以下方法来测定。即,使用反应液1(1.5mM HDAOS、0.05% TritonX100、50mM磷酸缓冲液、pH7.0)、以及反应液2(5mM 4-氨基安替比林、0.05% TritonX100、1%过氧化氢、50mM磷酸缓冲液、pH7.0)、稀释液(50mM磷酸缓冲液、pH7.0)。将0.3mL的反应液1和用稀释液稀释的测定对象0.08mL混合,在37℃下加热5分钟。之后加入0.1mL的反应液2,在37℃下进行反应,测定主波长600nm、副波长700nm的吸光度变化量。37℃反应后,测定2分钟到5分钟为止的吸光度变化量,计算过氧化物酶活性。例如,吸光度变化量若为10U/L以上,则可以说测定对象存在过氧化物酶活性,进一步具体而言,可以说包含过氧化物酶。

[0088] 第1试剂组合物的过氧化氢酶活性例如通过以下方法来测定。即,在过氧化氢酶活性测定中,使用底物(0.06%过氧化氢、50mM磷酸缓冲液、pH7.0)。将底物溶液2.0mL在25℃

预热后与测定对象0.1mL混合,测定240nm下的吸光度变化量。例如在25℃反应后测定0分钟至3分钟的吸光度变化量,计算过氧化氢酶活性。例如吸光度变化量若为50U/L以上,则可以说测定对象存在过氧化氢酶活性,进一步具体而言可以说包含过氧化氢酶。

[0089] 第1试剂组合物可以还具有其它酶活性,具体而言,可以还具有选自抗坏血酸氧化酶活性和脂蛋白脂肪酶(LPL)活性组成的组中的1种或2种以上酶活性。

[0090] 另外,第1试剂组合物例如可以包含具有选自具有抗坏血酸氧化酶活性的酶和具有脂蛋白脂肪酶活性的酶组成的组中的1种或2种以上酶活性的酶,进一步具体而言,包含选自抗坏血酸氧化酶和脂蛋白脂肪酶组成的组中的1种或2种以上的酶。

[0091] 第1试剂组合物中,从避免被检体中共存的抗坏血酸对测定的准确性造成的影响的角度出发,优选还具有抗坏血酸氧化酶活性,优选包含具有抗坏血酸氧化酶活性的酶,更优选包含抗坏血酸氧化酶。

[0092] 关于第1试剂组合物的抗坏血酸氧化酶活性,从避免被检体中共存的抗坏血酸对测定的准确性造成的影响的角度出发,优选0.1U/mL以上、更优选0.2U/mL以上,另外,优选15U/mL以下、更优选10U/mL以下。

[0093] 第1试剂组合物的抗坏血酸氧化酶活性例如通过以下方法来测定。即,在抗坏血酸氧化酶活性测定中,使用底物(将10mM抗坏血酸溶液-0.13mM EDTA用90mM KH_2PO_4 -5mM NaHPO_4 稀释20倍)。将底物1mL以30℃预热,经过5分钟后加入用包含0.05%BSA的90mM NaHPO_4 溶液稀释的测定对象0.1mL并混和,从而开始反应。经过5分钟后,加入反应终止液(0.2N HCl)3.0mL而使反应终止后,测定245nm下的吸光度,计算抗坏血酸氧化酶活性。例如,活性量若为10U/L以上,则可以说测定对象存在抗坏血酸氧化酶活性,进一步具体而言,可以说包含“抗坏血酸氧化酶”。

[0094] 另外,从更好地调整对各种脂蛋白的作用的角度出发,第1试剂组合物进一步具有脂蛋白脂肪酶活性,优选包含具有脂蛋白脂肪酶活性的酶,更优选包含脂蛋白脂肪酶。

[0095] 另外,本实施方式中,第1试剂组合物和后述的第2试剂组合物中的酶也可以利用以下方法鉴定。即,首先,利用混合型质谱仪检测用胰蛋白酶降解包含目标酶的试样而得到的片段肽。通过对由质谱仪得到的肽的质量、和在质谱仪内与氩气碰撞而得到的碎片离子的谱图(MS/MS数据)进行数据库检索(例如,Mascot检索)而能够鉴定蛋白质。若源自试剂组合物中的氨基酸序列的片段肽的序列与作为唯一序列登记在数据库中的氨基酸序列一致,则可认为包含对象酶。

[0096] 另外,第1试剂组合物和后述第2试剂组合物中的酶例如也可以通过以下的定量进行鉴定。即,选择用胰蛋白酶将目标酶分解而得到的片段肽中的目标酶特异性的、且在质谱分析中可以得到强信号的肽作为定量对象肽。对于定量对象肽,通过化学合成制作非标记的肽和作为内标的用稳定同位素标记的肽。利用胰蛋白酶将包含目标酶的试样完全消化,添加已知量的稳定同位素标记肽,通过与HPLC连接的三重四极杆型质谱仪(LC-MS/MS)以MRM模式(多反应监测模式)进行测定。同样地测定定量对象肽的非标记肽和已知量的稳定同位素标记肽的混合液,并制作内标的浓度比与峰面积比的标准曲线,计算试样中的定量对象肽的绝对量,由此能够对目标酶进行定量。

[0097] (其它成分)

[0098] 第1试剂组合物可以包含上述成分以外的成分。作为其它成分,可列举例如缓冲

液、盐、不具有酶作用的蛋白质、防腐剂、氢供体、偶联剂、聚氧乙烯单苯乙烯化苯基醚以外的表面活性剂。

[0099] 缓冲液的种类例如可以适当选择。作为缓冲液的具体例,可列举MOPS(3-吗啉代丙磺酸)缓冲液、磷酸缓冲液、Tris缓冲液、PIPES(哌嗪-1,4-双(2-乙磺酸))缓冲液、HEPES(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸)缓冲液。

[0100] 关于缓冲液的浓度,从保持组合物中的酶活性的观点和提高试剂的保存稳定性的观点出发,优选1mM以上、更优选5mM以上、进一步优选10mM以上,另外,优选300mM以下,优选200mM以下、进一步优选150mM以下、进一步更优选100mM以下。

[0101] 盐具体而言作为pH调节剂、或离子强度调节剂而配合。作为盐的具体例,可列举氢氧化钠、硫酸钠等钠盐;氢氧化钾等钾盐;氯化镁、硫酸镁等镁盐;硫酸铵、氯化铵等铵盐等碱性物质。另外,通过使第1试剂组合物包含1价的阳离子和2价的阳离子中的至少一种或它们的盐,由此sdLDL与L LDL的识别将变得更加容易。

[0102] 关于第1试剂组合物中的盐浓度,从作为pH调节剂、或离子强度调节剂更稳定地起作用的观点出发,相对于第1试剂组合物的全部组成优选2mmol/L以上、更优选5mmol/L以上,另外,优选50mmol/L以下、更优选30mmol/L以下。

[0103] 关于第1试剂组合物的pH,从保持组合物中的酶活性的观点和提高试剂的保存稳定性的观点出发,优选6.0以上、更优选6.5以上,另外,优选8.0以下、更优选7.5以下。

[0104] 作为不具有酶作用的蛋白质的具体例,可列举牛血清白蛋白(BSA)等白蛋白。

[0105] 关于第1试剂组合物中的BSA等的白蛋白浓度,从使第1试剂组合物中的酶稳定化的观点出发,另外从使第1工序、即除sdLDL以外的脂蛋白中胆固醇向反应体系外的导出稳定化的观点出发,相对于第1试剂组合物的全部组成优选1g/L以上、更优选2g/L以上,另外,优选20g/L以下、更优选10g/L以下。

[0106] 第1试剂组合物优选包含氢供体和偶联剂中至少一者,更优选包含氢供体和偶联剂中的任一者。此时,氢供体和偶联剂中的任一者用于在第1工序中将除sdLDL以外的脂蛋白中胆固醇导出到反应体系外。进一步具体而言,使胆固醇酯酶、胆固醇氧化酶作用于除sdLDL以外的脂蛋白中胆固醇,为了将所产生的过氧化氢在过氧化物酶存在下转化为无色醌而使用氢供体和偶联剂中的任一者。

[0107] 另外,从提高第1试剂组合物的保存性的观点出发,第1试剂组合物优选包含氢供体和偶联剂中的任一者,更优选包含氢供体且不包含偶联剂,进一步优选包含氢供体和过氧化物酶且不包含偶联剂。

[0108] 另一方面,从简便地确认第1试剂组合物在后述的第1工序中的反应性的观点出发,第1试剂组合物优选包含氢供体和偶联剂,进一步优选包含氢供体、偶联剂和过氧化物酶。从同样的观点出发,也优选第1试剂组合物包含偶联剂和过氧化物酶。

[0109] 作为氢供体的具体例,可列举N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-3-甲基苯胺(TOOS)、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-3,5-二甲基苯胺(MAOS)、N-乙基-N-(3-磺丙基)-3-甲基苯胺(TOPS)、N-(2-羟基-3-磺丙基)-3,5-二甲氧基苯胺(HDAOS)、N-(3-磺丙基)苯胺(HALPS)、N-(3-磺丙基)-3-甲氧基-5-苯胺(HMPS)、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-4-氟-3,5-二甲氧基苯胺(FDAOS)、N-乙基-N-(3-甲基苯基)-N'-琥珀酰基乙二胺(EMSE)等苯胺衍生物。

[0110] 关于第1试剂组合物中的氢供体的浓度,从将除sdLDL以外的脂蛋白中胆固醇导出

到反应体系外的观点出发,优选1mM以上、更优选1.5mM以上,另外,优选5mM以下、更优选3mM以下。

[0111] 另外,在后述的第2试剂组合物包含氢供体的情况下,优选用于偶联反应的偶联剂包含在第1试剂组合物中。作为偶联剂,可使用例如4-氨基安替比林(4AA)、氨基安替比林衍生物、香兰素二胺磺酸、甲基苯并噻唑啉酮脒、磺化甲基苯并噻唑啉酮脒等,但是不限于这些。

[0112] 关于第1试剂组合物中的偶联剂的浓度,相对于添加第1试剂组合物后的反应液的全部组成,从稳定地作用于sdLDL的观点出发,优选0.2mM以上、更优选0.3mM以上,另外,优选5.0mM以下、更优选3.3mM以下。

[0113] 本实施方式中,第1试剂组合物具有选自由胆固醇酯酶活性、胆固醇氧化酶活性和鞘磷脂酶活性组成的组中的1种或2种以上活性,并且包含聚氧乙烯单苯乙烯化苯基醚,因此有效地作用于除sdLDL以外的LDL且抑制对sdLDL的作用,对除sdLDL以外的LDL的选择性优异,可以优选用于sdLDL-C的定量。因此,通过使用本实施方式的第1试剂组合物,可以使sdLDL-C的测定准确性变得优异。

[0114] 本实施方式中,第1试剂组合物例如与后述的第2试剂组合物组合而用于sdLDL-C的定量中。

[0115] (试剂盒)

[0116] 本实施方式中,试剂盒用于试样中的sdLDL-C的定量中,包含上述第1试剂组合物和用于对sdLDL-C进行定量的第2试剂组合物。

[0117] 另外,试剂盒具体而言用于包括2个以上工序的sdLDL-C的定量方法。此时,第1和第2试剂组合物分别用于不同的工序中,优选按照第1和第2试剂组合物的顺序使用。

[0118] 以下对第2试剂组合物的构成进一步进行具体说明。

[0119] (第2试剂组合物)

[0120] 第2试剂组合物具体而言为用于对sdLDL-C进行定量的试剂组合物。第2试剂组合物的成分根据第1试剂组合物的构成而不同,只要为能够对sdLDL-C进行定量的配方组成即可,可以使用公知的物质。

[0121] 作为第2试剂组合物中所含的成分的具体例,可列举酶、缓冲液、盐、表面活性剂、不具有酶作用的蛋白质、防腐剂、以及氢受供体和偶联剂中的任一者。

[0122] 另外,试剂盒的优选构成中,第1试剂组合物包含氢供体和偶联剂中的任一者且不包含另一者,第2试剂组合物不包含氢供体和偶联剂中的一者且包含另一者。

[0123] 作为酶,可列举例如过氧化物酶。另外,第2试剂组合物例如具有过氧化物酶活性。关于第2试剂组合物的过氧化物酶活性,从在第2工序中准确地测定sdLDL-C的观点出发,优选500U/L以上、更优选1000U/L以上,另外,优选10000U/L以下。其中,第1试剂组合物中包含过氧化物酶活性的情况下,过氧化物酶活性会被带入到第2工序中,因此第2试剂中的浓度也可以降低或不包含。

[0124] 缓冲液和盐的种类例如可以根据第2试剂组合物中所含的酶的种类来适当选择。作为缓冲液的具体例,可列举关于第1试剂组合物而在上文列举的例子。

[0125] 关于第2试剂组合物的pH,从保持组合物中的酶活性的观点和提高试剂的保存稳定性的观点出发,优选6.0以上、更优选6.5以上,另外,优选8.0以下、更优选7.5以下。

[0126] 作为表面活性剂,可列举例如作用于sdLDL的表面活性剂。另外,从稳定地对sdLDL-C进行定量的观点出发,第2试剂组合物优选包含作用于sdLDL的表面活性剂。

[0127] 作用于sdLDL的表面活性剂可以为仅作用于sdLDL的表面活性剂等选择性地作用于sdLDL的表面活性剂,也可以为还作用于除sdLDL以外的脂蛋白的表面活性剂或作用于全部脂蛋白的表面活性剂。

[0128] 作为第2试剂组合物中的表面活性剂,可列举例如聚氧乙烯衍生物,另外,可以使用用于市售的总胆固醇测定用试剂等中的表面活性剂。作为所述表面活性剂,可列举例如聚氧乙烯辛基苯基醚等聚氧乙烯烷基苯基醚(例如EMULGEN909(花王公司制)、Triton X-100)、聚氧乙烯烷基醚(例如EMULGEN707、EMULGEN709(以上为花王公司制))。

[0129] 关于第2试剂组合物中的表面活性剂的浓度,相对于添加第2试剂组合物后的混合溶液,从稳定地作用于sdLDL的观点出发,优选0.05% (w/v) 以上、更优选0.1% (w/v) 以上、进一步优选0.5% (w/v) 以上。

[0130] 另外,从同样的观点出发,第2试剂组合物中的表面活性剂的浓度优选8.0% (w/v) 以下,更优选5.0% (w/v) 以下。

[0131] 第2试剂组合物包含偶联剂时,偶联剂优选为选自由4-氨基安替比林(4AA)、氨基安替比林衍生物、香兰素二胺磺酸、甲基苯并噻唑啉酮脒、磺化甲基苯并噻唑啉酮脒组成的组中的1种或2种以上化合物。

[0132] 关于第2试剂组合物中的偶联剂的浓度,相对于添加第2试剂组合物后的反应液的全部组成,从稳定地作用于sdLDL的观点出发,优选0.5mM以上、更优选1.0mM以上,另外,优选15mM以下、更优选10mM以下。

[0133] 另一方面,第1试剂组合物中包含偶联剂的情况下,氢供体优选包含在第2试剂组合物中。关于此时的氢供体在试剂中的浓度,相对于添加第2试剂组合物后的反应液的全部组成,从稳定地作用于sdLDL的观点出发,优选3mM以上、更优选4.5mM以上,另外,优选15mM以下、更优选12mM以下。

[0134] 作为不具有酶作用的蛋白质的具体例,可分别列举关于第1试剂组合物而在上文列举的例子。

[0135] (方法)

[0136] 本实施方式的方法是使用上述的第1和第2试剂组合物对试样中的sdLDL-C进行定量的方法。本实施方式的定量方法包括以下的第1工序和第2工序。

[0137] (第1工序) 使上述第1试剂组合物作用于试样的工序

[0138] (第2工序) 在第1工序之后,使上述第2试剂组合物进行作用,由此对残留的脂蛋白中的胆固醇进行定量的工序

[0139] 第1和第2试剂组合物的构成如上所述。所述方法中,通过使用本实施方式第1试剂组合物,从而在第1工序中能够使sdLDL-C以高选择性残留在反应液中,因此能够进行准确性优异的sdLDL-C测定。因此,例如还能够以高准确性稳定地对sdLDL-C进行定量。

[0140] 另外,sdLDL-C的定量方法例如可以通过下述来进行:向试样(被检体试样)中添加第1试剂组合物而使其反应,接着添加第2试剂组合物而使其反应,测定吸光度。

[0141] 被检体试样例如为血清、血浆等源自血液的试样,优选血清。

[0142] 第1和第2工序通常在自动分析装置内进行。

[0143] 试样的量、各试剂组合物的量例如可以考虑各试剂组合物中的试剂浓度等而适当确定,在能用于自动分析装置的范围内进行。例如可以使用被检体试样1~10 μ L、第1试剂50~300 μ L、第2试剂25~200 μ L。

[0144] 以下对各工序进一步进行具体说明。

[0145] (第1工序)

[0146] 第1工序中,使第1试剂组合物作用于试样。由此将除sdLDL以外的脂蛋白去除,使除sdLDL以外的脂蛋白中的胆固醇游离并将其导入反应体系外。

[0147] 进一步具体而言,第1工序中优选使作用于除sdLDL以外的脂蛋白的表面活性剂在胆固醇酯酶存在下作用于试样。并且,使来自脂蛋白的通过游离而产生的胆固醇与例如胆固醇氧化酶等与胆固醇进行反应的酶反应而将其导出到反应体系外。第1工序中,例如可以使用如下技术:将除sdLDL以外的脂蛋白中的胆固醇去除并导出到反应体系外,使除sdLDL以外的脂蛋白的胆固醇凝集或对其进行抑制而使其在后续工序中不反应等公知的技术。

[0148] 第1试剂组合物具有电子供体时,第1工序中,去除由除sdLDL以外的脂蛋白产生的胆固醇并将其导出到反应体系外的工序例如可以包括下述步骤:在通过第1试剂组合物中的胆固醇酯酶活性和胆固醇氧化酶活性产生的过氧化氢和电子供体的存在下形成无色醌。

[0149] 另外,第1工序中可以进一步在反应液中添加使用作为离子强度调节剂的1价阳离子和2价阳离子中的至少1种或它们的盐。通过添加离子强度调节剂,容易使sdLDL和LDL产生差别。

[0150] (第2工序)

[0151] 第2工序中,对经过第1工序而残留的sdLDL-C进行定量。第2工序中,可以使用以往使用的LDL的定量方法。例如,通过比浊测定来定量添加LDL凝集剂而形成的LDL特异性凝集物的含量的方法、使用利用LDL特异性抗体的抗原抗体反应的方法、使用酶对分解产物进行定量的方法等。定量方法例如可根据第2试剂组合物中所含的成分、组成来选择。

[0152] 第2试剂组合物包含酶时,可以采取使用酶对分解产物进行定量的方法。具体而言,向第1工序后的反应液中加入例如包含选自胆固醇酯酶、胆固醇氧化酶、胆固醇脱氢酶和过氧化物酶组成的组中的1种或2种以上胆固醇测定用酶的第2试剂组合物,使sdLDL-C游离、分解,对其反应产物进行定量。

[0153] 此时,第2试剂组合物优选包含上述表面活性剂。

[0154] 关于本实施方式中的各工序的反应温度,优选在2 $^{\circ}$ C~45 $^{\circ}$ C下进行,更优选在25 $^{\circ}$ C~40 $^{\circ}$ C下进行。

[0155] 反应时间对于各工序而言均优选进行1~10分钟,进一步优选进行3~7分钟。

[0156] 作为sdLDL-C的定量中使用的自动分析装置,可列举例如TBA-120FR、TBA-200FR(以上为东芝公司制)、JCA-BM1250、JCA-BM1650、JCA-BM2250(以上为日本电子公司制)、HITACHI7180、HITACHI7170(以上为日立公司制)、AU2700、AU5800、AU680(以上为OLYMPUS公司制)、cobas c501、cobas c701(以上为Roche公司制)等。

[0157] sdLDL-C的定量例如通过580~720nm的波长范围、优选600~700nm的波长范围的吸光度测定来进行。

[0158] 以上对本发明的实施方式进行了描述,但是这些为本发明的例示,也可以采用上述以外的各种构成。

[0159] 实施例

[0160] 下文中,POE单苯乙烯化苯基醚浓度的“%”具体而言为“(w/v)”。

[0161] (实验例1)

[0162] (实施例1~3和比较例1)

[0163] 为了评价各例的表面活性剂在sdLDL-C试剂中的反应性,制备下述试剂并进行了测定。

[0164] (试剂组合物的制备)

[0165] 按照以下浓度来配合以下所示的各成分,改变表面活性剂的种类而制备各例的第1试剂组合物。将第1试剂组合物的配方组成示于以下。

[0166] (第1试剂组合物)

PIPES 缓冲液、pH7.0	50mM
胆固醇酯酶	900U/L
胆固醇氧化酶	450U/L
鞘磷脂酶	525U/L
[0167] 过氧化物酶	1250U/L
牛血清白蛋白	0.75% (w/v)
TOOS	1.5mM
4AA	1mM

[0168] 表面活性剂*1

[0169] *1表面活性剂

[0170] 实施例1:POE单苯乙烯化苯基醚、POE的聚合度为11~33

[0171] 实施例2:POE单苯乙烯化苯基醚、POE的聚合度为13~37

[0172] 实施例3:POE单苯乙烯化苯基醚、POE的聚合度为50~80

[0173] 比较例1:POE的聚合度为2~32的POE二苯乙烯化苯基醚与POE的聚合度为5~30的POE三苯乙烯化苯基醚的混合物

[0174] (脂蛋白选择性的评价)

[0175] 为了评价利用第1试剂组合物的反应中的脂蛋白选择性,分别测定sdLDL和1bLDL与上述试剂组合物的反应性。

[0176] 具体而言,作为被检体,使用通过超离心从人血清中分离的sdLDL和1bLDL。为了确认表面活性剂对被检体的反应性,制备包含作为参与显色反应的成分的胆固醇酯酶、胆固醇氧化酶以及过氧化物酶、氢供体、偶联剂的上述第1试剂组合物。将被检体3 μ L和上述第1试剂组合物150 μ L混合,测定37℃、5分钟后的600nm(主波长)和700nm(副波长)的吸光度的差(表1和后述的表2中记载为“吸光度波长600nm/700nm”。)[mAbs],求出1bLDL的吸光度相对于sdLDL的吸光度的比。将测定结果示于表1。

[0177] [表1]

[0178] 表1

[0179]		实施例1	实施例2	实施例3	比较例1
	POE单苯乙烯化苯基醚 (%)	0.17	0.17	0.34	0
	1bLDL吸光度 (波长600/700nm) [mAbs]	256.3	235.2	177.7	157.2
	sdLDL吸光度 (波长600/700nm) [mAbs]	176.1	168.3	99.1	149.8
	1b/sd吸光度比	1.46	1.4	1.79	1.05

[0180] 根据表1, 包含POE单苯乙烯化苯基醚的各实施例与包含POE二苯乙烯化苯基醚、POE三苯乙烯化苯基醚且不含POE单苯乙烯化苯基醚的比较例相比, 1bLDL/sdLDL的吸光度比大, 表明第1试剂组合对1bLDL的选择性优异。

[0181] 因此, 通过使用包含POE单苯乙烯化苯基醚作为表面活性剂的各实施例的第1试剂组合, 能够以更高的准确性来定量试样中的sdLDL。

[0182] (实验例2)

[0183] 改变实施例1的POE单苯乙烯化苯基醚浓度, 除此以外与实验例1同样地求出1bLDL/sdLDL的吸光度比。将1bLDL/sdLDL比达到1.2以上的浓度作为允许浓度。

[0184] 将测定结果示于表2。

[0185] [表2]

[0186] 表2

[0187]	POE单苯乙烯化苯基醚 (%)	0.04	0.08	0.17	0.34	0.5	0.63
	1bLDL吸光度 (波长600/700nm) [mAbs]	347.9	318.3	256.3	188	135.2	122.3
	sdLDL吸光度 (波长600/700nm) [mAbs]	278.5	235.2	176.1	125.5	93	83
	1b/sd吸光度比	1.25	1.35	1.46	1.5	1.45	1.47

[0188] 根据表2, 在各浓度下, 第1试剂组合对1bLDL的选择性优异。

[0189] (实验例3)

[0190] 制备了使用实施例1中所用的POE单苯乙烯化苯基醚作为表面活性剂、且改变其浓度的第1试剂组合。通过比较对照法评价将其与第2试剂组合一起进行浓度已知的被检体的sdLDL-C测定时的准确性。具体而言, 制备实施例1所用的表面活性剂的浓度不同的以下的第1试剂组合和以下的第2试剂组合。向血清试样2 μ L中加入第1试剂组合75 μ L, 在37℃下反应5分钟后, 加入第2试剂组合75 μ L并反应5分钟, 测定主波长600nm、副波长700nm下的吸光度, 由另行制作的标准曲线计算sdLDL-C浓度。将第1试剂组合和第2试剂组合的配方组成示于以下。

[0191] (第1试剂组合)

	PIPES 缓冲液、pH7.0	50mM
	胆固醇酯酶	300U/L
	胆固醇氧化酶	600U/L
	鞘磷脂酶	2700U/L
	过氧化氢酶	1200KU/L
[0192]	抗坏血酸氧化酶	3000U/L
	牛血清白蛋白	10g/L
	TOOS	2.0mM
	表面活性剂 *1	0.05%、0.07%、0.09%、0.11%、 0.13%、0.16%、0.18%、0.20%或 0.30%
[0193]	(第2试剂组合物)	
	PIPES 缓冲液、pH7.0	50mM
	4-氨基安替比林	4.0mM
[0194]	过氧化物酶	5000U/L
	叠氮化钠	0.05% (w/v)
	聚氧乙烯烷基醚	1% (w/v)

[0195] 作为比较对照法,使用通过超速离心法、具体而言利用超速离心分离而分级出sdLDL并测定胆固醇的方法在以下条件下得到的sdLDL-C值,计算与由上述标准曲线算出的sdLDL-C浓度的相关系数。

[0196] 超速离心法的情况下,利用Clinical Chemistry,57,p.57-65,2011中记载的方法分离与sdLDL相当的密度 $1.044 \sim 1.063\text{g/cm}^3$ 的级分,测定sdLDL-C的浓度。

[0197] 将评价结果示于图1的(a)~图1的(c)、图2的(d)~图2的(f)和图3的(g)~图3的(i)。这些是示出sdLDL-C的浓度测定值的准确性的评价结果的图,横轴为用超速离心法(Ultracentrifugation:UCF)求出的测定值,纵轴是由上述标准曲线计算出的测定值。

[0198] 另外,将图1的(a)~图1的(c)、图2的(d)~图2的(f)和图3的(g)~图3的(i)的与POE单苯乙烯化苯基醚浓度的相关系数示于以下。

	浓度	相关系数 r
[0199]	图 1 的 (a) 0.05%	0.9085
	图 1 的 (b) 0.07%	0.9152
	图 1 的 (c) 0.09%	0.9198
	图 2 的 (d) 0.11%	0.9263
	图 2 的 (e) 0.13%	0.9304
	图 2 的 (f) 0.16%	0.9295
	图 3 的 (g) 0.18%	0.9296
[0200]	图 3 的 (h) 0.20%	0.9252
	图 3 的 (i) 0.30%	0.9240

[0201] 根据图1的(c)、图2的(d)~图2的(f)和图3的(g)~图3的(i)以及上述相关系数,图1的(c)、图2的(d)~图2的(f)和图3的(g)~图3的(i)中的POE单苯乙烯化苯基醚浓度即0.05~0.30%下,均实现了 $r>0.90$,能够准确地对sdLDL-C进行定量。

[0202] 其中,POE单苯乙烯化苯基醚浓度为0.11~0.30%时,实现了 $r>0.92$,能够更准确地对sdLDL-C进行定量。

[0203] 该申请基于2021年4月19日提出申请的日本申请日本特愿2021-070615号要求优先权,将其公开全部引入于此。

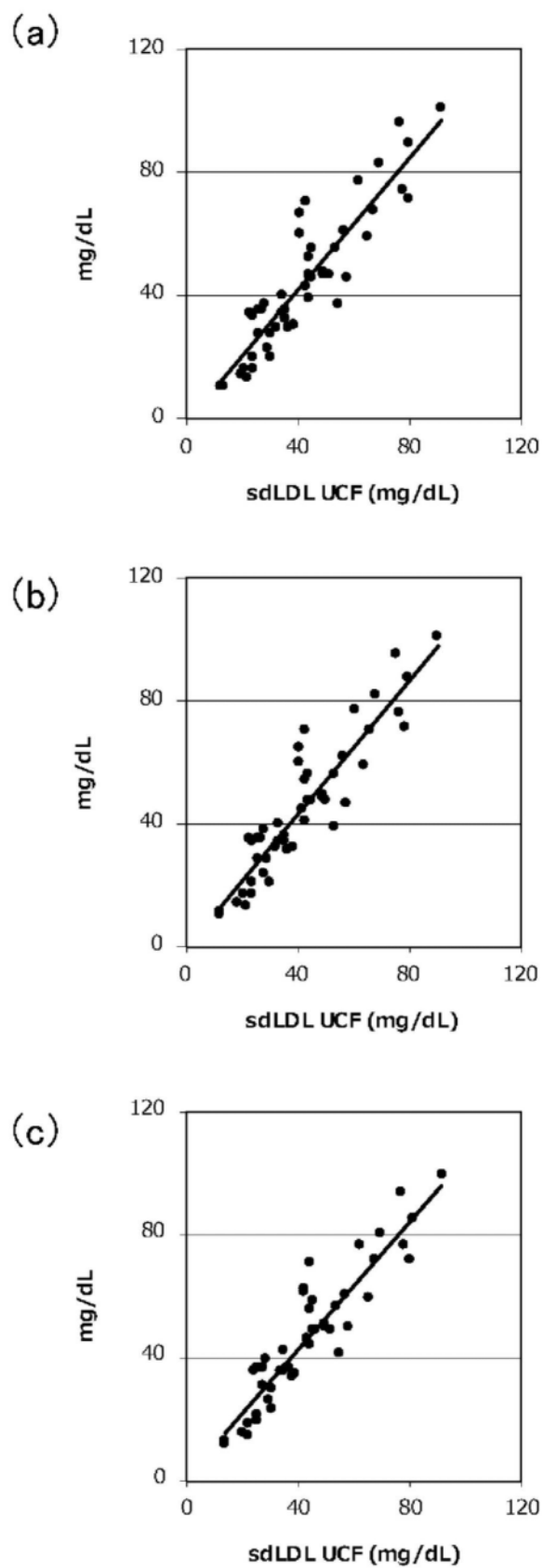


图1

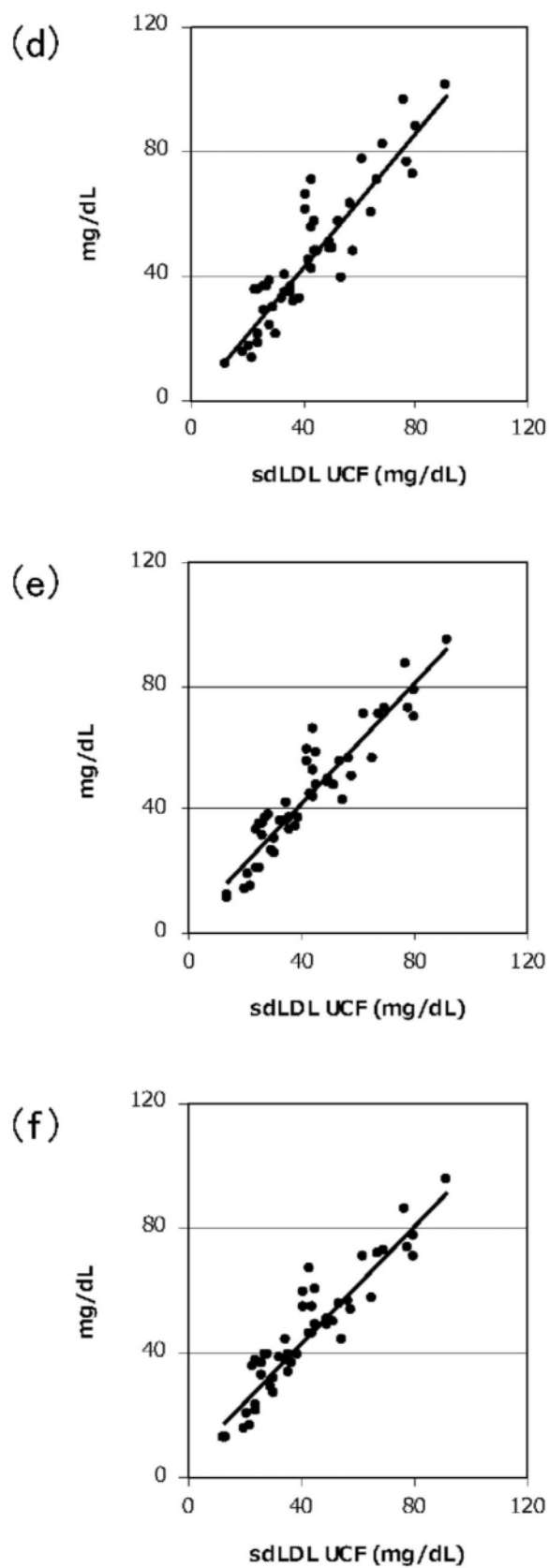


图2

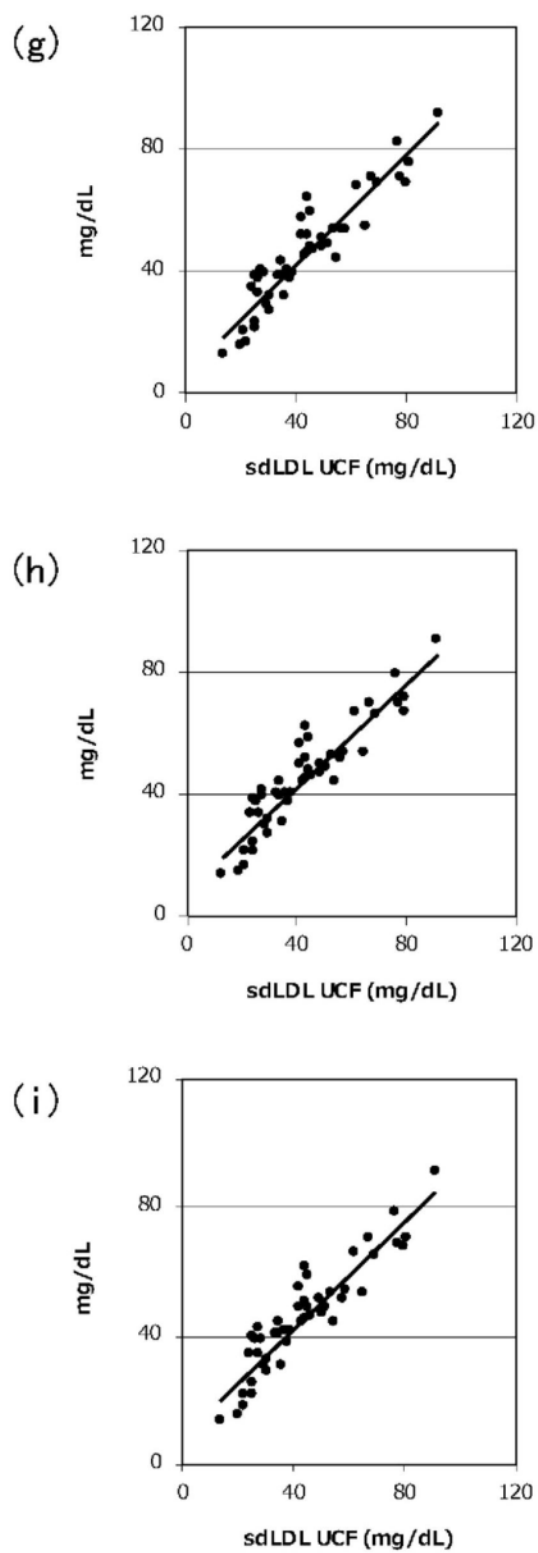


图3